

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成28年6月30日 (2016.6.30)

【公表番号】特表2015-516173(P2015-516173A)

【公表日】平成27年6月11日 (2015.6.11)

【年通号数】公開・登録公報2015-038

【出願番号】特願2015-512786(P2015-512786)

【国際特許分類】

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 P 5/00 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 1/21

C 1 2 P 5/00 Z N A

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成28年5月13日 (2016.5.13)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

イソプレレン生合成経路を含む非天然微生物生命体であって、前記イソプレレン生合成経路が、2 - メチル - 3 - ブテン - 2 - オール脱水酵素、2 - メチル - 3 - ブテン - 2 - オール異性化酵素、2 - メチル - 3 - ブテン - 2 - オール合成酵素、3 - メチル - 2 - ブテン - 1 - オール合成酵素およびこれらの任意の組み合わせから選択されるイソプレレン生合成経路の少なくとも 1 種の酵素をコードする外来核酸を含み、さらに、前記イソプレレン生合成経路が、イソプレレンを生成するために十分なレベルで発現される非天然微生物生命体。

【請求項 2】

イソプレレン生合成経路を含む請求項 1 に記載の非天然微生物生命体であり、前記イソプレレン生合成経路が、2 - メチル - 3 - ブテン - 2 - オール合成酵素によるジメチルアリルジホスファートの 2 - メチル - 3 - ブテン - 2 - オールへの変換、および 2 - メチル - 3 - ブテン - 2 - オール脱水酵素による 2 - メチル - 3 - ブテン - 2 - オールのイソプレレンへの変換を含む 2 ステップを含み、前記生物体が、3 - メチル - 2 - ブテン - 1 - オール合成酵素、2 - メチル - 3 - ブテン - 2 - オール合成酵素、および 2 - メチル - 3 - ブテン - 2 - オール脱水酵素をコードする外来核酸を含み、さらに、前記イソプレレン生合成経路がイソプレレンの合成に十分なレベルで発現する、請求項 1 に記載の非天然微生物生命体。

【請求項 3】

イソプレレン生合成経路を含む請求項 1 に記載の非天然微生物生命体であり、前記イソプレレン生合成経路が、3 - メチル - 2 - ブテン - 1 - オール合成酵素によるジメチルアリルジホスファートの 3 - メチル - 2 - ブテン - 1 - オールへの変換、2 - メチル - 3 - ブテン - 2 - オール異性化酵素による 3 - メチル - 2 - ブテン - 1 - オールの 2 - メチル - 3 - ブテン - 2 - オールへの変換、および 2 - メチル - 3 - ブテン - 2 - オール脱水酵素による 2 - メチル - 3 - ブテン - 2 - オールのイソプレレンへの変換を含み、前記生物体が、3 - メチル - 2 - ブテン - 1 - オール合成酵素、2 - メチル - 3 - ブテン - 2 - オール異性化酵素、および 2 - メチル - 3 - ブテン - 2 - オール脱水酵素をコードする外来核酸を含

み、さらに、前記イソプレン生合成経路がイソプレンの合成に十分なレベルで発現する、請求項 1 に記載の非天然微生物生命体。

【請求項 4】

前記生物体が、メチルエリトリートルホスファート経路の酵素、またはメバロナート経路の酵素から選択される少なくとも 1 種の酵素をコードする 1 種または複数種の内在性または外来性遺伝子を過剰発現する、請求項 1 から 3 に記載の非天然微生物生命体。

【請求項 5】

イソプレンへの変換に有用なジメチルアリルジホスファートが増加される、請求項 4 に記載の非天然微生物生命体。

【請求項 6】

前記 2 - メチル - 3 - ブテン - 2 - オール脱水酵素が、リナロール脱水酵素 - 異性化酵素である、請求項 1 または 2 に記載の非天然微生物生命体。

【請求項 7】

前記 3 - メチル - 2 - ブテン - 1 - オール合成酵素が、枯草菌 y q k G、枯草菌 y h f R、または大腸菌 y t j C由来であるホスファターゼである、請求項 1 または 3 に記載の非天然微生物生命体。

【請求項 8】

前記 3 - メチル - 2 - ブテン - 1 - オール合成酵素が、テルペン合成酵素、スイートバジル、レモンエゴマ、Perilla frutescans、またはCinnamomom tenuipile由来であるゲラニオール合成酵素である請求項 1 または 3 に記載の非天然微生物生命体。

【請求項 9】

前記テルペン合成酵素が、トウモロコシまたはOryza sativa由来であるファルネソール合成酵素である、請求項 8 に記載の非天然微生物生命体。

【請求項 10】

前記 2 - メチル - 3 - ブテン - 2 - オール脱水酵素がCastellaniella defragrans由来のリナロール脱水酵素 - 異性化酵素または 2 - メチル - 3 - ブテン - 2 - オール異性化酵素活性をさらに含む二機能性の酵素である、請求項 7 に記載の非天然微生物生命体。

【請求項 11】

前記微生物生命体が、大腸菌である、請求項 1 , 2 または 3 に記載の非天然微生物生命体。

【請求項 12】

前記 2 - メチル - 3 - ブテン - 2 - オール合成酵素が、テルペン合成酵素、クラーキア・ブレウエリ、シロイヌナズナ、セトエゴマ、Perilla frutescans、サルナシ、Actinidia polygama、クソニンジン、スイートバジル、またはウォーターミント由来であるリナロール合成酵素である、請求項 1 または 2 に記載の非天然微生物生命体。

【請求項 13】

前記メチルエリトリートルホスファート経路の前記少なくとも 1 種の酵素が、1 - デオキシ - D - キシルロース - 5 - ホスファート合成酵素、1 - デオキシ - D - キシルロース - 5 - ホスファートレダクトイソメラーゼ、4 - ジホスホシチジル - 2 - C - メチル - D - エリスリトール合成酵素、4 - ジホスホシチジル - 2 - C - メチル - D - エリスリトールキナーゼ、2 - C - メチル - D - エリスリトール - 2、4 - シクロジホスファート合成酵素、1 - ヒドロキシ - 2 - メチル - 2 - (E) - ブテニル - 4 - ジホスファート合成酵素、ジメチルアリル - ジホスファート / イソペンテニル - ジホスファート : NAD(P)⁺ 酸化還元酵素、イソペンテニルジホスファート異性化酵素、およびこれらの組み合わせから選択される、請求項 4 に記載の非天然微生物生命体。

【請求項 14】

イソプレンを生成する方法であって、炭素源を含む適切な培地中、前記非天然微生物が

少なくとも一部の前記炭素源をイソブレンに変換するような条件下で請求項 2 または 3 に記載の非天然微生物生命体を培養するステップ、および、任意選択で、前記イソブレンを回収するステップを含む方法。

【請求項 15】

ジメチルアリルジホスファートが、前記生物体により過剰発現され、かつ、メチルエリトリトールホスファート経路または前記メバロナート経路の少なくとも1種の酵素が、前記生物体により過剰発現されている、請求項 14 に記載の方法。